

1/39/1

DIALOG(R) File 345:Inpadoc/Fam.& Legal Stat  
(c) 2001 EPO. All rts. reserv.

3215781

Basic Patent (No,Kind,Date): ES 475500 A1 19790401 <No. of Patents: 001>

Patent Family:

Patent No	Kind	Date	Applic No	Kind	Date
ES 475500	A1	19790401	ES 475500	A	19781128 (BASIC)

Priority Data (No,Kind,Date):

ES 475500 A1 19781128

PATENT FAMILY:

SPAIN (ES)

Patent (No,Kind,Date): ES 475500 A1 19790401

METODO DE OBTENCION DE PROTEINAS Y AMINOACIDOS ESENCIALES PARA LA  
ALIMENTACION, POR TRATAMIENTO ELECTRONICO DE MICRO- ORGANISMOS  
FIJADORES DE N2 (Spanish)

Patent Assignee: CONSEJO SUPERIOR INVESTIGACION (ES)

Priority (No,Kind,Date): ES 475500 A1 19781128

Applic (No,Kind,Date): ES 475500 A 19781128

IPC: \* C12D

CA Abstract No: \* 91(11)089531Y

Language of Document: Spanish

SPAIN (ES)

Legal Status (No,Type,Date,Code,Text):

ES 475500	AA	20000201	ES FD1A	PATENT LAPSED (PATENTE
			CADUCIDADES)	
			19991207	

REST AVAILABLE COPY

0 91:089531/AN

=> s 91:89531/an

L2 1 91:89531/AN.

=> d cbib,ab

L2 ANSWER 1 OF 1 CA COPYRIGHT 2001 ACS

91:89531 Proteins and essential amino acids for nutrition by  
electronic treatment of nitrogen-fixing microorganisms. Martin Gonzalez,  
Antonio (Consejo Superior de Investigaciones Cientificas, Spain). Span.  
ES 475500 19790401, 7 pp. (Spanish). CODEN: SPXXAD. APPLICATION: ES  
1978-475500 19781128.

AB High yields of proteins and amino acids were obtained in a fermn. process  
using 1 of 9 strains of Azotobacter in the presence of an elec. field.

In

an example using A. vinelandii (strain 382 DSM) with sucrose as a  
C-source, the application of sinusoidal waves (5 V, 7 mA, and 20 Hz)  
increased the total amino acid prodn. 258% relative to that when the  
elec.

field was not applied.

=>

BEST AVAILABLE COPY

MINISTERIO DE INDUSTRIA Y ENERGIA  
Registro de la Propiedad Industrial



ESPAÑA

10 ES	11 NUMERO	12 A1
13	4.755.000	
14	FECHA DE PRESENTACION	
	28 de Noviembre de 1978	

PATENTE DE INVENCION

Concedido el Registro de acuerdo con los datos que figuran en la presente descripción y según el contenido de la Memoria adjunta.

20 FEB. 1979

15 PRIORIDADES: 11 NUMERO		12 FECHA
17 FECHA DE PUBLICACION	11 CLASIFICACION INTERNACIONAL C12D	12 PATENTE DE LA QUE ES DIVISIONARIA
15 TITULO DE LA INVENCION "Método de obtención de proteínas y aminoácidos esenciales para la alimentación, por tratamiento electrónico de microorganismos fijadores de N <sub>2</sub> "		
17 SOLICITANTE (ES) Consejo Superior de Investigaciones Científicas		
DOMICILIO DEL SOLICITANTE Serrano, 117 Madrid-6		
18 INVENTOR (ES) D. Antonio Martín Gonzalez		
19 TITULAR (ES) Consejo Superior de Investigaciones Científicas		
20 REPRESENTANTE D. Javier Trueba Gutierrez		

BEST AVAILABLE COPY

## MEMORIA DESCRIPTIVA

Muchas naciones subdesarrolladas no pueden tener un mínimo nivel proteínico y ésta es la causa más importante del hambre en estos países. Estas circunstancias han llevado a la búsqueda de nuevos caminos para conseguir nuevas reservas de proteínas, como ocurre en EE.UU. que es el principal exportador de semillas oleaginosas. En Europa Occidental el 80% de las proteínas de origen animal proceden de la importación, siendo del orden del 90% en la Comunidad Económica Europea. En vista de estos datos, la Comisión de Agricultura del Mercado Común se muestra pesimista al respecto y espera que en 1980 aún seguirá importando el 90%.

Por otra parte, el coste de los fertilizantes ha aumentado enormemente en los últimos cinco años, incluíendo por consiguiente en el mayor coste de los alimentos y en la restricción del suministro dietético de los países más subdesarrollados.

También, el alto coste del proceso Haber para sintetizar amoníaco, es consecuencia de la subida del petróleo, pues el hidrógeno requerido en dicha síntesis procede del gas natural o de los crudos y requiere además una gran cantidad de energía para su combinación, por cuya razón, el coste de los fertilizantes nitrogenados está íntimamente relacionado con el coste de los combustibles.

Podemos asegurar que para la producción de proteínas es necesario conseguir ricos fertilizantes nitrogenados y que éstos, química o microbiológicamente proceden del nitrógeno atmosférico. Cerca del 25% del nitrógeno fijado es amoníaco sintetizado por el proceso Haber, el resto, que se estima en 150 millones de toneladas métricas por año, proceden de la fijación microbiológica. El proceso de la fijación del  $N_2$ , implica el consumo de una gran cantidad de energía que es suministrada por el metabolismo de los glúcidos mediante el ATP. La molécula clave en la vía de fijación del  $N_2$ , es la nitrogenosa, que está formada por las hierro-sulfo-proteínas. El transporte de electrones --

BEST AVAILABLE COPY

tiene lugar a través de los dos componentes de la nitrogenasa para llegar a la completa reducción del  $N_2$  y posterior conversión en glutamina por reacción con el glutamato y la glutamín sintetasa de la célula.

5 Todo el complejo sistema se puede resumir en una reducción del  $N_2$  por transferencia electrónica mediante los átomos de Fe y Mo.

Este método de aplicación electrónica a cultivos de microorganismos fijadores de  $N_2$  (Azotobacter), demuestra que es posible activar el complejo mecanismo de la asimilación del  $N_2$ , consiguiendo aumentar en gran parte la biosíntesis de aminoácidos y dirigir su metabolismo según el tipo de onda suministrada y la frecuencia de la misma.

10 Esta activación tiene lugar mediante los iones de hierro de las ferredoxinas, puesto que el equilibrio de los iones  $Fe^{+2} / Fe^{+3}$  de los líquidos metabólicos en los cultivos de Azotobacter, es alterado en el sentido de aumentar la proporción de  $Fe^{+2}$  cuando son suministrados campos eléctricos.

15 En microorganismos que fijan  $N_2$  no se conocen experiencias en las que sean aplicadas ondas eléctricas para estudiar sus efectos, por lo que este método proporciona nuevos caminos para el estudio de la fijación del  $N_2$  y para la síntesis de proteínas y aminoácidos que son altamente potenciados según el tipo de onda eléctrica, potencial, intensidad y frecuencia de la misma.

20 El rendimiento de obtención de proteínas y aminoácidos por microorganismos que fijan  $N_2$  con este método electrónico puede ser aumentado al ir estudiando todas las constantes eléctricas en los puntos en que influyen más favorablemente en la biosíntesis de aminoácidos.

25 Utilizando, únicamente melazas de remolachas al 2% como sustrato y aplicando ondas cuadradas de 62 mA, 20 Hz y 7 V en fermentadores de 4 litros de medio, es posible conseguir células de Azotobacter vinelandii (208 CECT) que contienen un 56,3% de aminoácidos, siendo destacable por su importancia en la alimentación la proporción de metionina (6,57%), lisina (4,85%) y otros aminoácidos esenciales, que por la acción de los campos eléctricos aplicados, fueron potenciados con relación a los fermentadores testigo, 13,41 veces más en la concentración de metionina, 4,90 veces en la tirosina, 1,92 en la alanina y un 60% más en el total de todos los aminoácidos analizados.

BEST AVAILABLE COPY

La superficie de los electrodos sumergida en el líquido metabólico era la correspondiente a un hilo de platino de 5 cm de longitud y 0,40 mm de diámetro.

Cuando aplicábamos los campos eléctricos en un fermentador de 5 litros de capacidad con 4 litros de medio de cultivo, instalamos electrodos de platino con una superficie sumergida de 10 x 0,5 cm.

Las ondas eléctricas suministradas a los cultivos procedían de un generador modelo Exact de un rango de frecuencias de 0 a 2 MHz, siendo las frecuencias - 5 Hz y 200 KHz de ondas sinusoidales aplicadas en los cultivos de Azotobacter, los puntos óptimos en la activación del proceso reproductivo de las células.

La temperatura de todos los cultivos fué de 28°C durante todo el tiempo de incubación. Pasamos un caudal de aire estéril, saturado de humedad, de 150 litros /horas a una presión de 1 Kg/cm<sup>2</sup>, cuando los cultivos fueron incubados en un fermentador de 5 litros de capacidad con 4 litros de medio de cultivo y los matraces de 250 ml, con 100 ml de medio se incubaron en un incubador orbital (Controlled Environment Incubator Shaker N.B.S.) a 170 r.p.m. y 28°C.

### REIVINDICACIONES

Se reivindica como de nueva y propia invención la propiedad y explotación exclusiva de:

1) "METODO DE OBTENCION DE PROTEINAS Y AMINOACIDOS ESENCIALES PARA LA ALIMENTACION, POR TRATAMIENTO ELECTRONICO DE MICROORGANISMOS FIJADORES DE N<sub>2</sub>", caracterizado porque a un cultivo de microorganismos fijadores de N<sub>2</sub>, se le aplica un campo eléctrico de ondas sinusoidales y ondas cuadradas, cuyo rango de frecuencia oscila entre 0 y 2 MHz consiguiéndose un elevado aumento en el contenido en peso de casi todos los aminoácidos del líquido metabólico.

2) Un método, según reivindicación 1, y caracterizado por el empleo de nueve estirpes de Azotobacter como microorganismo fijador de N<sub>2</sub>.

3) Un método, según reivindicaciones 1 y 2, y caracterizado porque el microorganismo empleado es Azotobacter vinelandii 208 CECT y la composición del medio de cultivo es (g/l) K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,4; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,1; Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>, 0,001; FeCl<sub>3</sub>, 0,003

y 2% de melaza de remolacha.

4) Un método, según reivindicaciones 1 y 2, y caracterizado porque el microorganismo empleado es Azotobacter vinelandii 382 DSM y como fuente de carbono se emplea ácido benzóico al 1%.

5) Un método, según reivindicaciones 1 y 2, y caracterizado porque el microorganismo empleado es Azotobacter vinelandii 382 DSM y la fuente de carbono es sacarosa al 1,5%.

6) Un método, según reivindicaciones 1 y 2, y caracterizado por el empleo de Azotobacter vinelandii 382 DSM y acetato sódico al 0,5% como fuente de carbono.

7) Un método, según reivindicaciones 1 y 2, y caracterizado por el empleo de Azotobacter vinelandii 382 DSM y etanol al 1%.

8) Un método, según reivindicaciones 1, 4, 5, 6 y 7, y caracterizado porque el cultivo tiene una concentración de  $K_2HPO_4$  de 0,64 g/l y de  $KH_2PO_4$  de 0,16 g/l.

9) Un método, según reivindicaciones 1 y 2, y caracterizado por el empleo de las siguientes estirpes de Azotobacter: Azotobacter chroococcum, 203, 204, 205, 206 y 374 CECT; Azotobacter agilis 210 CECT y Azotobacter beijerinckii 181 CECT.

10) Un método, según reivindicación 1, y caracterizado porque la frecuencia eléctrica empleada varía de 5 Hz a 200 KHz.

11) Un método, según reivindicación 1, y caracterizado porque la temperatura del cultivo es de 28°C.

12) Un método, según reivindicación 1, y caracterizado porque el campo eléctrico se aplica mediante la introducción de unos electrodos de platino en el líquido metabólico.

13) "METODO DE OBTENCION DE PROTEINAS Y AMINOACIDOS ESENCIALES PARA LA ALIMENTACION, POR TRATAMIENTO ELECTRONICO DE MICROORGANISMOS FIJADORES DE  $N_2$ ", tal y como se describe en el cuerpo de esta

memoria y reivindicaciones que consta de 7 páginas escritas por una sola cara.

John Henry

BEST AVAILABLE COPY